

蛍光修飾オリゴヌクレオチドを用いた生体分子の放射線による 損傷量評価手法に関する研究

研究代表者：松尾 陽一郎（附属国際原子力工学研究所・特命助教）
共同研究者：泉 佳伸（附属国際原子力工学研究所・教授）、安田 仲宏（附属国際原子力工学研究所・教授）

概要	
	放射線による生体影響の要因は、DNA を中心とした生体分子の損傷が主であると考えられている。放射線による生体分子の損傷を高感度・簡便に検出する手法は、放射線による生体影響研究のために重要である。放射線による生体分子の損傷を高感度・簡便に検出する手法として、本申請課題では数十塩基程度のオリゴヌクレオチドを蛍光修飾したサンプルを用い、放射線による損傷量を蛍光イメージアナライザー、蛍光顕微鏡などにて読みとり、評価する手法を開発する。
関連キーワード	放射線、生体影響、DNA、線量評価

研究の背景および目的

放射線防護・放射線安全の観点から、個人線量計による被ばく量の管理は重要である。TLD 素子やガラスバッジ等が実用化されているが、これら既存の個人線量計のメカニズムは、物理・化学的作用を応用したものである。一方で、放射線影響の要因は細胞核中の DNA の切断や酸化損傷が主である。放射線による生体分子の損傷を高感度・簡便に検出する手法として、プラスミド DNA を対象と

したゲル電気泳動やコメットアッセイがあるが、解析に要する時間が長く、また感度の点で課題がある。これらの課題を解決するために、放射線による生体分子の損傷を高感度・簡便に検出する手法として、数十塩基程度のオリゴヌクレオチドを蛍光修飾したサンプルを用い、放射線による損傷量を蛍光イメージアナライザーや蛍光顕微鏡などで読みとり評価する手法を開発する。

研究の内容および成果

研究の内容

5' 末端を蛍光修飾分子 (6-FAM: 6-Carboxyfluorescein) で、3' 末端をクエンチャー物質 (TAMRA: Carboxytetramethyl-rhodamine) で修飾したオリゴヌクレオチドを緩衝液に溶解したものをサンプルとする。オリゴヌクレオチドに切断が生じていない状態では、オリゴヌクレオチドと蛍光修飾分子とクエンチャー物質は同一鎖上にあり、蛍光修飾分子に与えられた光エネルギーが分子内励起移動によりクエンチャー物質へ移動し、熱エネルギーとして放出されることが考えられる。従って、励起光を照射しても蛍光は抑制される。しかしながら、オリゴヌクレオチドに切断などの損傷が生じれば、クエンチャー物質による抑制効果が抑えられて蛍光が発せられると考えられる (Fig.1)。このことから、放射線照射によるオリゴ

ヌクレオチドの切断量は、励起光を照射した場合の蛍光量を介して評価できると考えられる。本課題では、蛍光修飾ヌクレオチドに対し、粒子線及びガンマ線を照射し、蛍光修飾ヌクレオチドの切断に伴って生じる蛍光量を測定した。異なる線種によるヌクレオチドの損傷の頻度を評価することへの適用性について検討した。

実験で用いたオリゴヌクレオチドは、27mer の両端に 6-FAM と TAMRA を修飾したものである。配列は次のとおりである。

[6-FAM]TCA-TCCTAGTCCTGTTGCTGCCAAGCT[TAMRA]。

サンプルは TE 緩衝液に溶解し、濃度は 100 μ M である。サンプルに放射線医学総合研究所 HIMAC を用い、ヘリウム粒子線 (150MeV, LET :

約 2.2 keV/ μ m) をバイナリーフィルター無しの場合で照射した。吸収線量は 0.01 Gy–10.0 Gy である。比較のために、大阪大学産業科学研究所のコバルト 60 照射施設の ^{60}Co 線源を用い、1Gy、10.0Gy のガンマ線を照射した(線量率: 0.16、1.6 Gy/min)。照射したサンプルについて、6-FAM の至適励起波長 494nm の励起光を照射した場合の、最大蛍光波長 516nm の蛍光量(以下、蛍光量)を蛍光分光光度計(F-4500、日立ハイテック)にて計測した。計測では 1cm 角の石英セルを用いた。計測条件としては、励起・蛍光側スリット幅:10nm、スキャンスピード 2400nm/min、ホトマル電圧 400V である。

研究成果

Fig.2 にガンマ線を照射した場合の蛍光量のグラフを示す(n=1)。Fig.2 から、吸収線量の増加に伴って蛍光量が増加していることが分かる。これは吸収線量の増加に伴い、クエンチャーによる抑制効果を失ったオリゴヌクレオチドが増加したことを示すものであり、オリゴヌクレオチドの切断に起因すると考えられる。Fig.3 にヘリウム粒子線を照射した場合の蛍光量のグラフを示す。Fig.3 に示すデータは、5 サンプルの測定結果の平均である(n=5)。ガンマ線の結果とは異なり、ヘリウム粒子線の吸収線量の増加に伴って蛍光量が減少していることが示唆された。蛍光物質 6-FAM のみをサンプルとして同様の実験を行った結果についても、同様の傾向が確認された。この要因として、ヘリウム粒子線による 6-FAM の放射線分解、もしくはサンプルの取り扱いに起因する酸化分解が生じている可能性が考えられる。蛍光物質及びクエンチャー物質の放射線分解についての粒子線及びガンマ線照射の場合のデータを蓄積し、本手法の適用性について検討を行う必要がある。今後、今回用いたヘリウム粒子線より軽い粒子である陽子線、重い炭素粒子線などを照射した場合の蛍光量を評価する予定である。また、粒子線及びガンマ線照射の場合のポリアクリルアミドゲル電気泳動等により、ヌクレオチドの切断量を評価し、蛍光量との関係を精査する計画である。

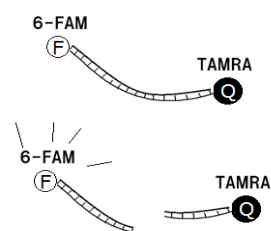


Fig. 1 蛍光修飾オリゴの概念図。(上) クエンチャー物質の抑制が効いた状態、(下) 切断が生じ、クエンチャー物質による抑制が抑えられ蛍光が観測できる状態。

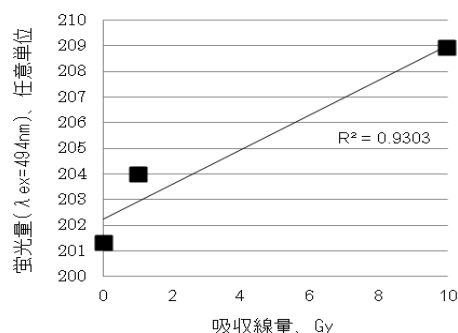


Fig. 2 ガンマ線照射の場合の 6-FAM の蛍光量

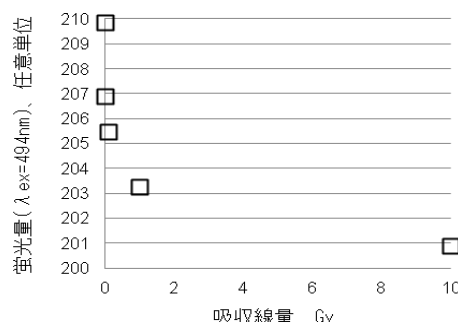


Fig. 3 ヘリウム粒子線照射の場合の 6-FAM の蛍光量 (λ_{ex}=494nm、λ_{em}=516nm)

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「成果発表」

ISORD-7 (7th International Symposium on Radiation Safety and Detection Technology), 2013. 7. 15-2013/7/18, Sanya, China (予定)。

「特記事項」

本研究は、放射線医学総合研究所「重粒子線がん治療装置等共同利用研究」の一環として行なわれた。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・種目: 若手研究 B・期間: 平成 25 年度~27 年度・研究課題: 蛍光修飾オリゴヌクレオチドを用いた放射線による生体分子損傷量の新規評価手法の開発 課題代表者として申請した。